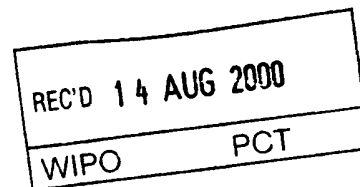


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

EP00/5274



4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 62 409.7

Anmeldetag: 22. Dezember 1999

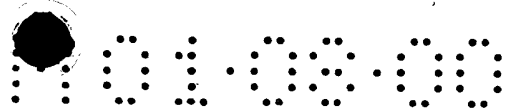
Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Δ 6-Acetylenase und Δ 6-Desaturase aus
Ceratodon purpureus

IPC: C 12 N, A 01 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit
5 Δ^6 -Acetylenase- und/oder Δ^6 -Desaturaseaktivität codiert,
ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1,
10 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degene-
rierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1,
15 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nuklein-
säuresequenz ableiten,
 - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder
20 SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für
Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Amino-
säuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf
Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische
Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz
25 gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte
Sequenz.
- 30 4. Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß
Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder
mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1
35 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz ge-
mäß Anspruch 1 oder mindestens ein Expressionskassette gemäß
Anspruch 4 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.
40
7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus
um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.

8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine funktionelle oder nicht funktionelle Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
- 5
9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
- 10
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
- 15
- 20
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit einer Dreifachbindung oder mit einer Doppelbindung in Δ -6-Position oder einer Dreifachbindung und Doppelbindung in Δ -6-Position aufweisen.
- 25
12. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
- 30
13. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 35
14. Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 40
15. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 13 oder 14 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.
- 45
16. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens einem der Proteine gemäß Anspruch 2, 13 oder 14 inkubiert.

3

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Triglyceride in Gegenwart einer Verbindung hergestellt werden, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.
- 5 18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.
19. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 18.
- 10 20. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10, 16 oder 17.
- 15 21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
- 20 22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
- 25 23. Verwendung von ungesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 19 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten gemäß Anspruch 20 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.

30

35

40

45

H010900

 Δ 6-Acetylenase und Δ 6-Desaturase aus Ceratodon purpureus

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von

- 10 DNA Sequenzen codierend für Δ 6-Acetylenase/ Δ 6-Desaturasen bzw. Δ 6-Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ 6-Dreifachbindungen und/oder Δ 6-Doppelbindungen.

15

Außerdem betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäuresequenz; eine Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem be-

- 20 trifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen

- 25 in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden
- 30 beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form
- 35 ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen

- 45 Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geänderten

5 Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und

10 WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In

15 WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al.,

20 Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

In WO 97/37033 wird eine Δ -12-Acetylenase beschrieben. Durch dieses Enzym lassen sich ungesättigte C_{18} -Fettsäuren mit einer Dreifachbindung herstellen. Derartige Fettsäuren können neben der

25 Anwendung in Nahrungsmittel aufgrund ihrer Reaktivität auch zur Herstellung von Polymeren verwendet werden. Sperling et al. berichtete auf einer Tagung (South Lake Tahoe, Canada, June 9 - 13, 1999) über die Klonierung eines Enzyms, das ebenfalls Dreifachbindungen in Fettsäuren einführt. Wobei sich die Substrate dieses

30 Enzyms von denen der Δ -12-Acetylenase unterscheiden und die Dreifachbindung an anderer Position durch das Enzym in die Fettsäuren eingeführt wird.

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in trans-

35 genen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrum zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, daß die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere

40 Mengen an Ölen isoliert werden.

3

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen.

5

Es bestand daher die Aufgabe weitere Enzyme für die Synthese ungesättigter konjugierter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit Δ -6-Acetylenase- und/oder

10 Δ -6-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,

15 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,

20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

25

Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die 30 dieselben enzymatischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 kodierten Enzyme katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in Δ 6-Position. Unter ungesättigten 35 Fettsäuren sind im folgenden einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen aufweisen, zu verstehen. Die Dreifach- und/oder Doppelbindungen können konjugiert oder nicht konjugiert sein. Die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten 40 Sequenzen kodieren für ein neue Enzyme, die eine Acetylenase- und/oder Δ 6-Desaturase-Aktivität aufweisen.

Das erfindungsgemäße Enzym Δ 6-Acetylenase/ Δ 6-Desaturase führt vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine cis-Doppelbindung in Position C₆-C₇ ein und/oder konvertiert eine bereits 45 vorhandene cis-Doppelbindung in Position C₆-C₇ in eine Dreifachbindung (siehe SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3). Das Enzym hat

außerdem eine $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität, die vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ einführt. Diese Aktivität hat auch das Enzym mit der in SEQ ID NO: 11 genannten Sequenz. Bei dem es

5 sich um eine monofunktionelle $\Delta 6$ -Desaturase handelt.

Die erfindungsgemäße(n) Nukleinsäuresequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer

10 genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

15 Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 70 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vor-

20 teilhaft mindestens 75 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE

25 (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic. Acid Res., 12, 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete

30 Aminosäuresequenzen sind Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 12 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens 70 % identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 65 % Homolog, bevorzugt mindestens 70 %, be-

35 sondern bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt mindesten 80 %.

Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der

40 abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise

45 mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standard-



- bedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Acetylenase- und/oder Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.
- 15 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden

und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

- Außerdem sind unter Homologen der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 5 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren 10 können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

- Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, 15 deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

- 20 Unter Derivaten sind auch die Antisense-DNAs zu verstehen, die zur Hemmung der Proteinbiosynthese der erfindungsgemäßen Proteine verwendet werden können. Diese Antisense-DNAs gehören zu den erfindungsgemäßen nichtfunktionellen Derivaten, wie Derivate, die 25 keine enzymatische Aktivität aufweisen. Weitere dem Fachmann bekannte Methoden der Herstellung von nichtfunktionellen Derivaten sind die sogenannte Cosuppression, die Verwendung von Ribozymen und Introns. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die Einzelstrang Nukleinsäuren wie mRNA, zu 30 denen sie eine Komplementarität aufweisen, schneiden können. Dadurch können mit Hilfe dieser Ribozyme (Haselhoff and Gerlach, Nature, 334, 1988: 585-591) mRNA-Transkripte katalytisch gespalten werden und so die Translation dieser mRNA unterdrückt werden. Derartige Ribozyme können speziell auf ihre Aufgaben hin 35 zugeschnitten werden (US 4,987,071; US 5,116,742 und Bartel et al., Science 261, 1993: 1411-1418). Mit Hilfe der Antisense-DNA können dadurch Fettsäuren, Lipide oder Öle mit einem erhöhten Anteil an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.

- 40 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen $\Delta 6$ -Acetylenase/ 45 $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden

Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum* ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

10

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für das $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kodieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, das heißt die enzymatische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

20

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Gehaltes von $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der

Pflanze durch Überexpression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C. et al., *Journal of Molecular Biology* 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten werden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität

sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. eine Signalsequenz für das ER, die das $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Vorteilhaft können die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- bzw.

- 10 $\Delta 6$ -Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen. Für die in-vivo und speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen
- 15 vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

- Unter den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4
- 20 oder SEQ ID NO: 12 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltene Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Proteins erhalten
- 25 bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physiko-
- 30 chemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge ver-
- 35 tauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.

Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer

- 40 ursprünglich isolierten für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion, das heißt deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist, zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen
- 45 oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der



$\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist
10 (= Enzymaktivität stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise
15 eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäßen Expressionskassette geeignete codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Über-
20 produktion von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen und/oder Doppelbindungen in $\Delta 6$ -Position verleihen. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren
25 Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion
30 exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche
40 Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen
45 Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regu-

- lationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor
- 5 das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-
- 10 Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die $\Delta 6$ -Acetylenase-/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.
- 15 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der
- 20 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- 25 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere ein pflanzliche Promotoren oder Promotoren, die aus einem Pflanzenvirus entstammen. Vorteilhaft
- 30 Regulationsssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, λ -*P_R*- oder im λ -*P_L*-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationsssequenzen sind beispielsweise in den
- 35 gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren wie *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *STLS1*, *B33*, *nos* (= Nopalinsynthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die
- 40 Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE- und/oder $\Delta 6$ -DESATURASE-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige vorteilhafte Pflanzen-
- 45 promotoren sind beispielsweise der *PRP1*-Promotor [Ward et al., Plant.Mol. Biol. 22(1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer

(Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO93/21334) Promotor. Weitere Pflanzen-
5 promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-
10 spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm oder im sich entwickelnden Embryo. Insbesondere zu nennen sind
15 vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen
20 Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle geeignete Promotoren wie der Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus
25 Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des lpt2- oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die
30 Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.
35

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und
40 Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):
45 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):



233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des *lpt2* oder *lpt1*-Gens aus Gerste (W095/15389 und W095/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

- 5 In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die Gene der $\Delta 6$ -ACETYLENASE/ $\Delta 6$ -DESATURASE- und/oder $\Delta 6$ -DESATURASE liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 5$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die $\Delta 12$ -Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, β -Ketoacyl-ACPSynthasen oder β -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.
- 15
- Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.
- 20
- 25 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange-
- 30
- 35
- 40
- 45
- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region

für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

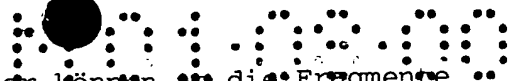
Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer-repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die



Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente
Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-
- 5 Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb
- 10 der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die
- 15 für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene
- 20 DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- 25 Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel
- 30 hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog
- 35 zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
- 40 austauschbar.

- Die DNA Sequenz codierend für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus* beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fett-
- 45 säure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert

und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, sodaß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- 5 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER),
- 10 Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

- Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-
- 15 sequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenz-
- 20 assay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielsweise seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das β -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizier-
- 25 barkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

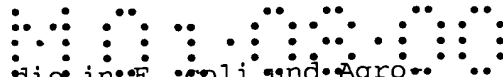
- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressions-
- 35 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und/oder $\Delta 6$ -Desaturase DNA se-
- 40 quenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen
- 45 kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewähr-

leistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-
5 Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu
10 exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem
15 Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind
20 beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M13mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium
25 pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in More
30 Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge
35 University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefepromotoren sind beispielsweise 2 μ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenpromotoren sind pLGV23, pGHLac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder
40 Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985 , ISBN 0 444 904018) entnommen werden.
45 Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog.

17



shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in *E. coli* und *Agrobacterium* replizieren.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassette.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden. Fig. 1 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-mit 35S-Promotor (C) bzw. pBin-USP mit dem USP-Promotor (D). Die Ausgangsvektoren sind in Fig. 1 A) und B) dargestellt.

Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

45

In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions-oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen
5 können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig
10 werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

15

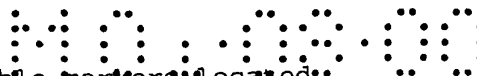
Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase
20 beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.

Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185,
25 Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Niederlande].

Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa
30 (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development
35 for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressions-
40 vektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

45 Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992)



"New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

5

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiel für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:

- 10 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma, Adenovirus 2, Cyto-megalovirus oder Simian Virus 40. Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
15 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen
35 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte
40 particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering
45 and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise

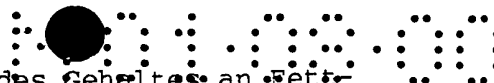
- wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

- Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

- Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielfhaft seien Pflanzen wie *Arabidopsis*, Asteraceae wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Cyanobakterien, Ciliaten, Algen oder

- Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptomonas* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise *C. elegans*.
- 10 Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).
- 15 Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen codierend für ein $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gen oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Ziel der Verwendung
- 25 ist die Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit erhöhtem Gehalt an Dreifachbindungen und Doppelbindung in $\Delta 6$ -Position.
- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des
- 30 $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie
- 35 deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanze enthaltend eine erfindungsgemäße funktionelle oder nicht funktionelle (= Antisense-DNA oder enzymatische inaktives Enzym) Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle
- 40 Expressionskassette.
- Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase-
- 45 und/oder $\Delta 6$ -Desaturasegenesequenz kann darüber hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen, Ciliaten



und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen eingesetzt werden.

- 5 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder
- 10 $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in den erfindungsgemäßen Organismen vorteilhaft in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumindest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- 15 Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so daß eine samenspezifische Expression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder
- 20 Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.
- 25 Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.
- 30 Die Wirksamkeit der Expression des Transgens $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gens und deren Auswirkung
- 35 auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend eine

- 40 $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baum-
- 45 wolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

- Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung sind wie oben
- 5 beschriebenen transgene Pflanzen, die eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle oder nicht funktionelle erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Unter nicht funktionell ist zu verstehen, daß kein enzymatisch aktives Protein mehr syn-
- 10 thetisiert wird. Außerdem ist unter nicht funktionellen Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten auch eine sogenannte Antisense-DNA zu verstehen, die zu transgenen Pflanzen führt, die eine Reduktion der enzymatischen Aktivität oder keine enzymatischen Aktivität aufweisen. Mit Hilfe der Antisense-Technik,
- 15 speziell wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz mit anderen Fettsäuresynthesegenen in der Antisense-DNA kombiniert wird, ist es möglich Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren bzw. gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren
- 20 Kulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 25 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA'-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder
- 30 Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase- und/oder $\Delta 6$ -Desaturase-DNA-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem
- 35 Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Dreifachbindungen oder delta-6-Doppelbindungen durch Expression dieser $\Delta 6$ -Acetylenase/Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 8 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 40 - Protein enthaltend die in SEQ ID NO: 10 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 45 - Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 8 und SEQ ID NO: 10 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes

- 5 Nukleinsäurekonstrukt in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt. Diese ungesättigten Fettsäuren enthalten vorteilhaft $\Delta 6$ -Dreifach- und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen. Die Fett-
- 10 säuren können aus den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden.

Auch ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekenn-

- 15 zeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens eine erfindungsgemäße Expressionskassette in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

20

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit

- 25 mindestens einem der Protein, das durch eine der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 oder SEQ ID NO: 11 kodiert wird, inkubiert. Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können. Anschließend
- 30 können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

- 35 Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit $\Delta 6$ -Dreifach- und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

Mit Hilfe der sogenannten Antisense-Technologie können in einem

- 40 Verfahren auch Fettsäuren oder Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt werden.

Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais,

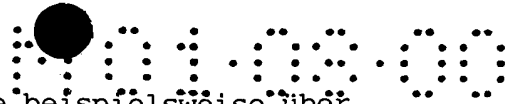
- 45 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Raps und Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Alfalfa, Erdnuß, Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme,



- Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Cyanobakterien, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie
- 5 Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, *Calendula*, Erdnuß, Kakao-
- 10 bohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, *Carthamus* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirts-
- 15 organismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls
- 20 Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden
- 25 oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.
- 30 Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut.

- Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher-
- 35 weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei
- 40 Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.
- 45 Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfolgen. Nach



Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen ist möglich.

- 10 Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicherweise verseift.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

- 20 Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

- 25 Beispiel 1:

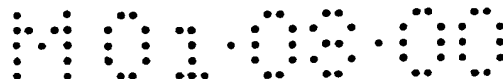
Allgemeine Klonierungsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2:

- 40 Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.



Beispiel 3:

Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

5

Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58Cl:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nor-

- 10 deutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter
- 15 steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petri-schale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Konkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weiter-
- 20 geführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikrom Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten
- 25 sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstums-hormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

Beispiel 4:

30 Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

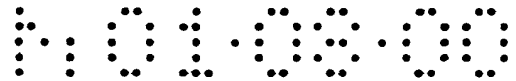
Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* Var. Columbia Col 0 (Lehle Seeds, Round Rock, Texas, USA) erfolgte mittels Blüten-infiltrationsmethode wie beschrieben bei: Bechtold, N., Ellis, J.

35 and Pelletier, G. in Planta, *Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*, C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences 316 (1993), 1194-119 oder mittels Wurzeltransformationsmethode.

40 Beispiel 5:

Die Transformation von Maispflanzen erfolgte wie bei Paredy, D., Petolino, J., Skokut, T., Hopkins, N., Miller, M., Welter, M., Smith, K., Clayton, D., Pescitelli, S., Gould, A., Maize Trans-

45 formation via Helium Blasting. Maydica. 42(2): 143-154, 1997, beschrieben.



Beispiel 6:

Isolierung und Klonierung der $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

5

Um DNA-Sequenzen aus *Ceratodon purpureus* zu isolieren, die für eine $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturase und eine $\Delta 6$ -Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von DNA-Sequenzen abgeleitet, die für $\Delta 5$ - (EMBL Accession-Nr. Z81122) und

10 $\Delta 6$ -Fettsäure-Desaturasen (U79010, AJ222980, AF031477 kodieren:

Primer A: 5'-TGG TGG AA(A/G) TGG A(A/C)I CA(C/T) AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
WWKW(N/T/K)H(N/K)

15

Primer B: 5'-(T/G)GI TGG AA(A/G) (T/G)(G/A)I (A/C)AI CA(C/T)
AA-3'
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz
(G/W)WK(E/D/W)(N/Q/K)H(N/K)

20

Primer C: 5'-AT (A/T/G/C)T(T/G) (A/T/G/C)GG (A/G)AA (A/T/
G/C)A(A/G) (A/G)TG (A/G)TG -3', reverse primer, abge-
leitet von der Aminosäuresequenz (I/M)(H/Q/N)PF(L/F)HH

25 Mittels Polymerasekettenreaction (PCR) mit Einzelstrang-cDNA aus *C. purpureus* wurden mit Primer A und Primer C zwei DNA-Fragmente von 557 bp (Cer3) und 575 bp (Cer16) Länge und mit Primer B und Primer C ein DNA-Fragment von 560 bp (Cer1) Länge amplifiziert. Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt:

30 10 min bei 94°C, Pause für 'hot start' bei 72°C, gefolgt von 32 Zyklen von 20 s bei 94°C, 1 min bei 45°C (Bindungstemperatur, T_m) und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus von 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Für die Amplifikation wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

35

Die oben genannten doppelsträngigen DNA-Fragmente aus den zwei PCR-Amplifikationen wurden in den pGEM-T Vektor (Promega) legiert, in *E. coli* XL1blue MRF' Kan (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

40 Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) sequenziert. Die DNA-Teilsequenzen von Cer1 und Cer3 zeigten 70 % Identität. Die oben genannten DNA-Teilsequenzen kodierten ohne Primer für offene Leserahmen bei Cer1 von 173 Aminosäuren (SEQ ID NO: 5 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer1 und SEQ ID NO: 6 =

45 Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer1), bei Cer 3 von 172 Aminosäuren (SEQ ID NO: 7 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer3 und SEQ ID NO: 8 = Partielle deduzierte Amino-

säuresequenz von Cer3) und bei Cer16 von 178 Aminosäuren (SEQ ID NO: 9 = Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer16 und SEQ ID NO: 10 = Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer16). Die abgeleitete Proteinsequenz von Cer1 wies 64 % zu Cer3 und 28 % identische Aminosäuren zu Cer16 auf; Cer 3 und Cer16 wiesen wiederum 27 % identische Aminosäuren auf.

Die höchste Ähnlichkeit der Cer1- und Cer3-Proteine besteht zu der $\Delta 6$ -Acyllipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* 10 (Girke et al., Plant J., 15, 1998: 39-48), während Cer16 die höchste Ähnlichkeit zu der $\Delta 6$ -Acyllipid-Desaturase und der $\Delta 8$ -Sphingolipid-Desaturase aus höheren Pflanzen aufweist.

Eine gerichtete λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* wurde 15 von Fritz Thummler, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt (Pasentsis et al., Plant J., 13, 1, 1998: 51-61). Es wurde ein PCR-Test dieser *Ceratodon*-Bank durchgeführt, bei dem spezifische Primer von den oben genannten DNA-Teilsequenzen Cer1, Cer3 und Cer16 abgeleitet wurden:

20 Spezifische forward und reverse Primer:

Cer1: 5'-CGAATGAGTGCACGAAC -3' + 5'-AATAACCTGGGCTCTCAC-3'
Cer3: 5'-ATGAGGATATTGATACTCTC-3' + 5'-GCAATCTGGGCATTACG-3'
25 Cer16: 5'-GACATCAAAGCTCTTCTC-3' + 5'-GGCGATGAGAAGTGGTTC-3'

Eine Restriktionsanalyse (Hind III bzw. EcoR V) der aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifizierten Produkte zeigte in allen drei Fällen das gleiche Restriktionsmuster wie das der PCR-Amplifikate 30 aus der ss-cDNA, d.h. die *Ceratodon*-cDNA-Bank enthält die drei Klone Cer1, Cer3 und Cer16.

Beispiel 7:

35 cDNA-Bank Screening und Sequenzierung der "full length" Klone

DNA-Minipräparationen, der drei aus ss-cDNA amplifizierten PCR-Fragmente Cer1, Cer3, Cer16 von ~570 bp Länge in pGEM-T (siehe Beispiel 6) wurden für das weitere Screening der vollständigen 40 Klone aus einer λ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* an M. Lee und S. Stymne abgegeben. Dieses cDNA-Bank-Screening führte bisher zu zwei vollständigen Klonen von Cer1 und Cer3 mit Inserts von ca. 2,2 kb, die als EcoR I / Kpn I-Fragmente aus dem λ ZAP-Vektor in die EcoR I / Kpn I-Schnittstellen des puc19-Vektors 45 (New England Biolabs) subkloniert und in *E. coli* JM105 transformiert wurden.

34

5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3'
'). Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in
den Vektor pBinAR eingesetzt. Es entsteht das Plasmid mit der
Bezeichnung pBinUSP.

5

Das Konstrukt wird zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*
und Rapspflanzen eingesetzt.

- Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und
10 Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach
Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im
Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet
und auf D6-Acetylenase/Desaturase -Expression mittels Lipid-
analysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an Acetylen-
15 fettsäuren oder Doppelbindungen an der delta-6-position werden
identifiziert. Es läßt sich in den stabil transformierten trans-
genen Linien, die das Transgen funktionell exprimieren, ein
erhöhter Gehalt von Acetylenfettsäuren und Doppelbindungen an
der delta-6-position im Vergleich zu untransformierten Kontroll-
20 pflanzen feststellen.

Beispiel 11:

Lipidextraktion aus Samen

25

Die Analyse von Lipiden aus Pflanzensamen verläuft analog der
Analyse von Hefelipiden. Jedoch wird Pflanzenmaterial zunächst
mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion
zugänglich zu machen.

30

35

40

45



Tab. 1

Fatty acids	pYES2					Cer1/pYES2					Cer3/pYES2				
[mol %]	-	18:2	γ -18:3	α -18:3	18:4	-	18:2	γ -18:3	α -18:3	18:4	-	18:2	γ -18:3	α -18:3	18:4
16:0	26.2	24.1	27.8	27.4	32.7	24.2	23.1	26.2	25.7	26.5	26.5	23.3	28.1	29.2	29.6
16:1 ⁹	41.8	9.6	27.4	27.3	16.1	36.5	13.3	24.7	28.8	21.9	43.8	9.9	25.2	34.0	20.9
16:2 ^{6,9}						6.9	1.8	3.3	5.3	3.0	1.1		0.1	0.8	0.1
18:0	6.5	5.3	6.1	6.1	7.9	6.4	6.1	6.6	6.5	7.1	5.5	5.3	6.3	5.8	5.9
18:1 ⁹	23.6	4.9	15.1	14.8	11.3	24.9	8.8	15.6	20.0	16.8	21.4	5.3	15.7	14.3	11.5
18:2 ^{6,9}						0.3		0.2	0.3	0.2	0.1			0.1	
18:2 ^{9,12}	53.9					41.9					42.3				
18:3 ^{6,9,12}			19.5			0.8	16.1				8.1	21.2			
18:3 ^{9,12,15}			22.8						10.0					11.9	
18:4 ^{6,9,12,15}			28.8						1.7	21.3				1.9	30.1
18:3 ^{6,9,9,12}						1.3	4.6								
18:4 ^{6,9,9,12,15}									2.3						
Σ Des. [mol %]	-	-	-	-	-	7.2	3.9	8.1	7.3	5.5	1.2	8.1	0.1	2.8	0.1

1

SEQUENZPROTOKOLL

0010900

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> D6-Acetylenase und D6-Desaturase aus Ceratodon
purpureus

<130> 99 1388

<140>

<141>

<150> 19925718.3

<151> 1999-06-07

<160> 12

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2040

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<220>

<221> CDS

<222> (176)..(1627)

<400> 1

ctcaggcagg tctcagttga tgagacgctg agttctgaat cctttgagct gtgtcaggct 60

cggcacttgt gggatggtga aggagtgatc gatcaggagt gcaggagctg cattagtttc 120

tcagggtcga tcaggttatt ctgaaaaagg ctgcgtctgt gagcagtttg caaaa atg 178
Met
1gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca tgg agc aag 226
Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser Lys
5 10 15tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg cct act ttg 274
Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr Leu
20 25 30aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg gga cag aca 322
Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln Thr
35 40 45ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act tac tct ctg 370
Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser Leu

2

M 0 1 0 0 0 0

50

55

60

gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg atg atc gtc 418
 Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile Val
 70 75 80

aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac cac cct gga 466
 Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro Gly
 85 90 95

ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca gac gtt ttc 514
 Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe
 100 105 110

gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat gac tac tac 562
 Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr Tyr
 115 120 125

att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg ctt aaa gac 610
 Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys Asp
 130 135 140 145

tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt ttc aag agt 658
 Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys Ser
 150 155 160

tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca gct ctc ttt 706
 Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu Phe
 165 170 175

gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac tgg gct att 754
 Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala Ile
 180 185 190

gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag tgt gga tgg 802
 Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly Trp
 195 200 205

ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac cgt acc gcg 850
 Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr Ala
 210 215 220 225

aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt ggc ttt agt 898
 Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe Ser
 230 235 240

gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act gct ccg aat 946
 Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro Asn
 245 250 255

gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att gat act ctc 994

3

Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu
 260 265 270

ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt gag agc aag 1042
 Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys
 275 280 285

aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att ctg cct cta 1090
 Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro Leu
 290 295 300 305

ttg ttc atg gcc cgg tac agt tgg act ttt gga agt ttg ctc ttc aca 1138
 Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe Thr
 310 315 320

ttc aat cct gat ttg agc acg acc aag gga ttg ata gag aag gga aca 1186
 Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly Thr
 325 330 335

gtt gct ttt cac tac gcc tgg ttc agt tgg gct gcg ttc cat att ttg 1234
 Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile Leu
 340 345 350

ccg ggt gtc gct aag cct ctt gcg tgg atg gta gca act gag ctt gtg 1282
 Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu Val
 355 360 365

gcc ggt ttg ttg ttg gga ttc gtg ttt acg ttg agt cac aat gga aag 1330
 Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly Lys
 370 375 380 385

gag gtt tac aat gaa tcg aag gac ttc gtg aga gcc cag gtt att acc 1378
 Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile Thr
 390 395 400

acc cgt aac acc aag cga ggc tgg ttc aac gat tgg ttc act ggg gga 1426
 Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly
 405 410 415

ctc gac acc cag att gag cat cac ctg ttt cca aca atg ccc agg cac 1474
 Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His
 420 425 430

aac tac ccc aag atc gca cct cag gtc gag gct ctt tgc aag aag cac 1522
 Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys His
 435 440 445

ggc ctc gag tac gat aat gtc tcc gtc gtt ggt gcc tct gtc gcg gtt 1570
 Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala Val
 450 455 460 465

4

BIOLOGICAL

gtg aag gcg ctc aag gaa att gct gat gaa gcg tca att cgg ctt cao 1618
Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu His
470 475 480

gct cac taa gaaatcgctg aactttgact attcattttt ttcgcctggc 1667
Ala His

tacctcaaatt gttcgggagc aggtgcttgg cagtgtgttc aaccggagcg cactgaaaat 1727

gtgcagaatc catttccaga aattaccatt cctagctaaa tcttcttttt accaggtcgg 1787

atatatgaaa ctttttttgat gcaacaagta gcattcaatt gaagacattg ttcgagatat 1847

aattcgcagt gtttctattc agcgggcata cgtactagtc catatcggcg gttgccgaga 1907

gtttacatta ttagttggca caacgagtag atctagtgtg aatttctatt tccgcatgta 1967

atattactct gaatatatac cgttatctat tttcctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2027

aaaaaaaaaa aaa 2040

<210> 2

<211> 483

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 2

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser
1 5 10 15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr
20 25 30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln
35 40 45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser
50 55 60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile
65 70 75 80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro
85 90 95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val
100 105 110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr
115 120 125

NOI 08 00

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys
130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys
145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu
165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala
180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly
195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr
210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe
225 230 235 240

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro
245 250 255

Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr
260 265 270

Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser
275 280 285

Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro
290 295 300

Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe
305 310 315 320

Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly
325 330 335

Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile
340 345 350

Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu
355 360 365

Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly
370 375 380

Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile
385 390 395 400

6



Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
 405 410 415

Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
 420 425 430

His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys
 435 440 445

His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala
 450 455 460

Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu
 465 470 475 480

His Ala His

<210> 3

<211> 1467

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1461)

<400> 3

ggatccaaa atg gcc ctc gtt acc gac ttt ctg aac ttt ctg ggc acg aca 51
 Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr
 1 5 10

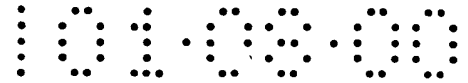
tgg agc aag tac agc gtg tac acc cat agc tat gct gga aac tat ggg 99
 Trp Ser Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly
 15 20 25 30

cct act ttg aag cac gcc aaa aag gtt tct gct caa ggt aaa act gcg 147
 Pro Thr Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala
 35 40 45

gga cag aca ctg aga cag aga tcg gtg cag gac aaa aag cca ggc act 195
 Gly Gln Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr
 50 55 60

tac tct ctg gcc gat gtt gct tct cac gac agg cct gga gac tgc tgg 243
 Tyr Ser Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp
 65 70 75

atg atc gtc aaa gag aag gtg tat gat att agc cgt ttt gcg gac gac 291
 Met Ile Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp



cac cct gga ggg acg gta att agc acc tac ttt ggg cgg gat ggc aca	339
His Pro Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr	
95 100 105 110	
gac gtt ttc gca aca ttc cat cca cct gcc gca tgg aag caa ctc aat	387
Asp Val Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn	
115 120 125	
gac tac tac att gga gac ctt gct agg gaa gag ccc ctt gat gaa ttg	435
Asp Tyr Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu	
130 135 140	
ctt aaa gac tac aga gat atg aga gcc gag ttt gtt aga gaa ggg ctt	483
Leu Lys Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu	
145 150 155	
ttc aag agt tcc aag gcc tgg ttc ctg ctt cag act ctg att aat gca	531
Phe Lys Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala	
160 165 170	
gct ctc ttt gct gcg agc att gcg act atc tgt tac gac aag agt tac	579
Ala Leu Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr	
175 180 185 190	
tgg gct att gtg ctg tca gcc agt ttg atg ggt ctc ttc gtc caa cag	627
Trp Ala Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln	
195 200 205	
tgt gga tgg ctt gcc cat gat ttc ctt cat caa cag gtc ttt gag aac	675
Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn	
210 215 220	
cgt acc gcg aac tcc ttc ttt ggc tat ttg ttc ggc aat tgc gtg ctt	723
Arg Thr Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu	
225 230 235	
ggc ttt agt gta tca tgg tgg agg acg aag cac aac att cat cat act	771
Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr	
240 245 250	
gct ccg aat gag tgc gac gaa cag tac aca cct cta gac gaa gac att	819
Ala Pro Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile	
255 260 265 270	
gat act ctc ccc atc att gcc tgg agc aag gaa att ttg gcc acc gtt	867
Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val	
275 280 285	
gag agc aag aga att ttg cga gtg ctt caa tat cag cac tac atg att	915

8

Glu Ser Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile
 290 295 300

ctg cct cta ttg ttc atg gcc cgg tac agt tgg act ttt gga agt ttg 963
 Leu Pro Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu
 305 310 315

ctc ttc aca ttc aat cct gat ttg agc acg acc aag gga ttg ata gag 1011
 Leu Phe Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu
 320 325 330

aag gga aca gtt gct ttt cac tac gcc tgg ttc agt tgg gct gcg ttc 1059
 Lys Gly Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe
 335 340 345 350

cat att ttg ccg ggt gtc gct aag cct ctt gcg tgg atg gta gca act 1107
 His Ile Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr
 355 360 365

gag ctt gtg gcc ggt ttg ttg ttg gga ttc gtg ttt acg ttg agt cac 1155
 Glu Leu Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His
 370 375 380

aat gga aag gag gtt tac aat gaa tcg aag gac ttc gtg aga gcc cag 1203
 Asn Gly Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln
 385 390 395

gtt att acc acc cgt aac acc aag cga ggc tgg ttc aac gat tgg ttc 1251
 Val Ile Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe
 400 405 410

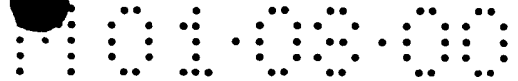
act ggg gga ctc gac acc cag att gag cat cac ctg ttt cca aca atg 1299
 Thr Gly Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met
 415 420 425 430

ccc agg cac aac tac ccc aag atc gca cct cag gtc gag gct ctt tgc 1347
 Pro Arg His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys
 435 440 445

aag aag cac ggc ctc gag tac gat aat gtc tcc gtc gtt ggt gcc tct 1395
 Lys Lys His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser
 450 455 460

gtc gcg gtt gtg aag gcg ctc aag gaa att gct gat gaa gcg tca att 1443
 Val Ala Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile
 465 470 475

cgg ctt cac gct cac taa gtgcac 1467
 Arg Leu His Ala His
 480



<210> 4
<211> 483
<212> PRT
<213> Ceratodon purpureus

<400> 4

Met Ala Leu Val Thr Asp Phe Leu Asn Phe Leu Gly Thr Thr Trp Ser
1 5 10 15

Lys Tyr Ser Val Tyr Thr His Ser Tyr Ala Gly Asn Tyr Gly Pro Thr
20 25 30

Leu Lys His Ala Lys Lys Val Ser Ala Gln Gly Lys Thr Ala Gly Gln
35 40 45

Thr Leu Arg Gln Arg Ser Val Gln Asp Lys Lys Pro Gly Thr Tyr Ser
50 55 60

Leu Ala Asp Val Ala Ser His Asp Arg Pro Gly Asp Cys Trp Met Ile
65 70 75 80

Val Lys Glu Lys Val Tyr Asp Ile Ser Arg Phe Ala Asp Asp His Pro
85 90 95

Gly Gly Thr Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val
100 105 110

Phe Ala Thr Phe His Pro Pro Ala Ala Trp Lys Gln Leu Asn Asp Tyr
115 120 125

Tyr Ile Gly Asp Leu Ala Arg Glu Glu Pro Leu Asp Glu Leu Leu Lys
130 135 140

Asp Tyr Arg Asp Met Arg Ala Glu Phe Val Arg Glu Gly Leu Phe Lys
145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Trp Phe Leu Leu Gln Thr Leu Ile Asn Ala Ala Leu
165 170 175

Phe Ala Ala Ser Ile Ala Thr Ile Cys Tyr Asp Lys Ser Tyr Trp Ala
180 185 190

Ile Val Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Val Gln Gln Cys Gly
195 200 205

Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His Gln Gln Val Phe Glu Asn Arg Thr
210 215 220

Ala Asn Ser Phe Phe Gly Tyr Leu Phe Gly Asn Cys Val Leu Gly Phe
225 230 235 240

10

H O I O O O O O

Ser Val Ser Trp Trp Arg Thr Lys His Asn Ile His His Thr Ala Pro
245 250 255

Asn Glu Cys Asp Glu Gln Tyr Thr Pro Leu Asp Glu Asp Ile Asp Thr
260 265 270

Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Glu Ile Leu Ala Thr Val Glu Ser
275 280 285

Lys Arg Ile Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Tyr Met Ile Leu Pro
290 295 300

Leu Leu Phe Met Ala Arg Tyr Ser Trp Thr Phe Gly Ser Leu Leu Phe
305 310 315 320

Thr Phe Asn Pro Asp Leu Ser Thr Thr Lys Gly Leu Ile Glu Lys Gly
325 330 335

Thr Val Ala Phe His Tyr Ala Trp Phe Ser Trp Ala Ala Phe His Ile
340 345 350

Leu Pro Gly Val Ala Lys Pro Leu Ala Trp Met Val Ala Thr Glu Leu
355 360 365

Val Ala Gly Leu Leu Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Ser His Asn Gly
370 375 380

Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe Val Arg Ala Gln Val Ile
385 390 395 400

Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
405 410 415

Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
420 425 430

His Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Pro Gln Val Glu Ala Leu Cys Lys Lys
435 440 445

His Gly Leu Glu Tyr Asp Asn Val Ser Val Val Gly Ala Ser Val Ala
450 455 460

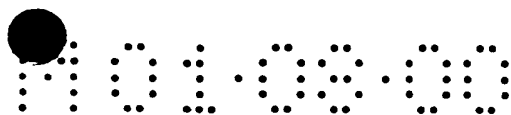
Val Val Lys Ala Leu Lys Glu Ile Ala Asp Glu Ala Ser Ile Arg Leu
465 470 475 480

His Ala His

<210> 5

<211> 520

11



<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<400> 5

cattcatcat actgctccga atgagtgcga cgaacagtac acacctctag acgaagacat 60
tgatactctc cccatcattg cctggagcaa ggaaattttg gccaccgttg agagcaagag 120
aattttgcga gtgcttcgat atcagcacta catgattctg cctctattgt tcatggcccg 180
gtacagttgg acttttggaa gtttgctctt cacattcaat cctgatttga gcacgaccaa 240
gggattgata gagaagggaa cagttgcttt tctactacgcc tggttcagtt gggctgcgtt 300
ccatattttg cggggtgtcg ctaagcctct tgcgtggatg gtagcaactg agcttgtggc 360
cggtttggtg ttgggattcg tgtttacgtt gagtcacaat ggaaaggagg tttacaatga 420
atcgaaggac ttcgtgagag cccaggttat taccaccgtt aacaccaagc gaggctggtt 480
caacgattgg ttcactgggg gactcgacac ccagattgag 520

<210> 6

<211> 173

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 6

Ile	His	His	Thr	Ala	Pro	Asn	Glu	Cys	Asp	Glu	Gln	Tyr	Thr	Pro	Leu
1				5					10					15	
Asp	Glu	Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Ile	Ile	Ala	Trp	Ser	Lys	Glu	Ile
			20					25					30		
Leu	Ala	Thr	Val	Glu	Ser	Lys	Arg	Ile	Leu	Arg	Val	Leu	Gln	Tyr	Gln
			35				40					45			
His	Tyr	Met	Ile	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Met	Ala	Arg	Tyr	Ser	Trp	Thr
	50					55				60					
Phe	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Thr	Phe	Asn	Pro	Asp	Leu	Ser	Thr	Thr	Lys
65					70					75					80
Gly	Leu	Ile	Glu	Lys	Gly	Thr	Val	Ala	Phe	His	Tyr	Ala	Trp	Phe	Ser
			85					90						95	
Trp	Ala	Ala	Phe	His	Ile	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	Lys	Pro	Leu	Ala	Trp
			100					105						110	
Met	Val	Ala	Thr	Glu	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Phe	Val	Phe

12

115

120

125

Thr Leu Ser His Asn Gly Lys Glu Val Tyr Asn Glu Ser Lys Asp Phe
130 135 140

Val Arg Ala Gln Val Ile Thr Thr Arg Asn Thr Lys Arg Gly Trp Phe
145 150 155 160

Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asp Thr Gln Ile Glu
165 170

<210> 7

<211> 514

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<400> 7

cctgcatcat gctgctccga atgaatgcga ccaaaagtac acgccgattg atgaggatat 60
tgatactctc cccatcattg cttggagtaa agatctcttg gccactgttg agagcaagac 120
catgttgcca gttcttcagt accagcacct attctttttg gttcttttga cgtttgcccg 180
ggcgagttgg ctatttttga gcgcggcctt cactctcagg cccgagttga cccttggcga 240
gaagcttttg gagaggggaa cgatggcttt gcactacatt tggtttaata gtgttgcgtt 300
ttatctgctc cccggatgga aaccagttgt atggatgggtg gtcagcgagc tcatgtctgg 360
tttctgctg ggatacgtat ttgtactcag tcacaatgga atggaggtgt acaatacgtc 420
aaaggacttc gtgaatgcc agattgcac gactcgcgac atcaaagcag ggggtgtttaa 480
tgattgggtc accggaggtc tcaacagaca gatt 514

<210> 8

<211> 172

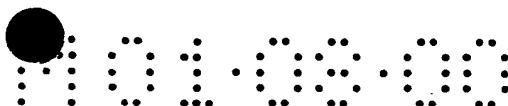
<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 8

Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile
1 5 10 15
Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu
20 25 30
Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln
35 40 45

13



His Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu
50 55 60

Phe Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu
65 70 75 80

Lys Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn
85 90 95

Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met
100 105 110

Val Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val
115 120 125

Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val
130 135 140

Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn
145 150 155 160

Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
165 170

<210> 9

<211> 535

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

<400> 9

tgctcatcac atcgctgta atagtataga atatgatcca gacctacagt acatccccct 60

ttttgcagtg acatcaaagc tcttctctaa cctctactcc tacttctatg aaagggttat 120

gccattcgat ggcgtagcac gctctctgat tgcctaccag cactggacgt tttatccaat 180

aatggctggt gctcgggtga acctctttgc ccaatccctt ctagtactga cctcgaagaa 240

gcatgtgcc aacaggtggc ttgagctcgg tgctatcggt ttcttctacc tgtggttctt 300

caccctcttg tcttacctgc cactgcacc ggagaggctt gcttctgtcc ttgtcagttt 360

tgcagtgaca gggatccagc atgtacagtt ttgcctgaac cacttctcat cgccggttta 420

tctaggacag ccgaagagca aggcttgggt tgaatctcaa gcacggggca ctctcaatct 480

ctctacaccg gcttacatgg attggtttca cgggggtctt cagttccaga tcgag 535

14

H 01.09.00

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 10

Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Ile Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln

1

5

10

15

Tyr Ile Pro Leu Phe Ala Val Thr Ser Lys Leu Phe Ser Asn Leu Tyr

20

25

30

Ser Tyr Phe Tyr Glu Arg Val Met Pro Phe Asp Gly Val Ala Arg Ser

35

40

45

Leu Ile Ala Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Ile Met Ala Val Ala

50

55

60

Arg Val Asn Leu Phe Ala Gln Ser Leu Leu Val Leu Thr Ser Lys Lys

65

70

75

80

His Val Pro Asp Arg Trp Leu Glu Leu Gly Ala Ile Gly Phe Phe Tyr

85

90

95

Leu Trp Phe Phe Thr Leu Leu Ser Tyr Leu Pro Thr Ala Pro Glu Arg

100

105

110

Leu Ala Phe Val Leu Val Ser Phe Ala Val Thr Gly Ile Gln His Val

115

120

125

Gln Phe Cys Leu Asn His Phe Ser Ser Pro Val Tyr Leu Gly Gln Pro

130

135

140

Lys Ser Lys Ala Trp Val Glu Ser Gln Ala Arg Gly Thr Leu Asn Leu

145

150

155

160

Ser Thr Pro Ala Tyr Met Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln

165

170

175

Ile Glu

<210> 11

<211> 2160

<212> DNA

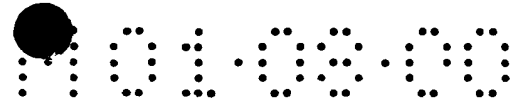
<213> Ceratodon purpureus

<220>

<221> CDS

<222> (159)..(1721)

15



<400> 11

cggaggtctc ttgtcgttct tggagttctgt gtcgagcttg gaatgcggta ggcgcggccg 60

tttcgtgggtt ttggcgttgg cattgcgcga ggcgcggacag tgggagtgcg ggaggtctgt 120

ttgtgcatga cgaggtgggtt gtaatcttcg ccggcaga atg gtg tcc cag ggc ggc 176

Met Val Ser Gln Gly Gly

1

5

ggg ctc tcg cag ggt tcc att gaa gaa aac att gac gtt gag cac ttg 224

Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Leu

10

15

20

gca acg atg ccc ctc gtc agt gac ttc cta aat gtc ctg gga acg act 272

Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu Asn Val Leu Gly Thr Thr

25

30

35

ttg ggc cag tgg agt ctt tcc act aca ttc gct ttc aag agg ctc acg 320

Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe Ala Phe Lys Arg Leu Thr

40

45

50

act aag aaa cac agt tcg gac atc tcg gtg gag gca caa aaa gaa tcg 368

Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val Glu Ala Gln Lys Glu Ser

55

60

65

70

gtt gcg cgg ggg cca gtt gag aat att tct caa tcg gtt gcg cag ccc 416

Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser Gln Ser Val Ala Gln Pro

75

80

85

atc agg cgg agg tgg gtg cag gat aaa aag ccg gtt act tac agc ctg 464

Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys Pro Val Thr Tyr Ser Leu

90

95

100

aag gat gta gct tcg cac gat atg ccc cag gac tgc tgg att ata atc 512

Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln Asp Cys Trp Ile Ile Ile

105

110

115

aaa gag aag gtg tat gat gtg agc acc ttc gct gag cag cac cct gga 560

Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe Ala Glu Gln His Pro Gly

120

125

130

ggc acg gtt atc aac acc tac ttc gga cga gac gcc aca gat gtt ttc 608

Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Ala Thr Asp Val Phe

135

140

145

150

tct act ttc cac gca tcc acc tca tgg aag att ctt cag aat ttc tac 656

Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys Ile Leu Gln Asn Phe Tyr

155

160

165

atc ggg aac ctt gtt agg gag gag ccg act ttg gag ctg ctg aag gag 704

16

Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr Leu Glu Leu Leu Lys Glu	170	175	180
tac aga gag ttg aga gcc ctt ttc ttg aga gaa cag ctt ttc aag agt	752		
Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser	185	190	195
tcc aaa tcc tac tac ctt ttc aag act ctc ata aat gtt tcc att gtt	800		
Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu Ile Asn Val Ser Ile Val	200	205	210
gcc aca agc att gcg ata atc agt ctg tac aag tct tac cgg gcg gtt	848		
Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr Lys Ser Tyr Arg Ala Val	215	220	230
ctg tta tca gcc agt ttg atg ggc ttg ttt att caa cag tgc gga tgg	896		
Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe Ile Gln Gln Cys Gly Trp	235	240	245
ttg tct cac gat ttt cta cac cat cag gta ttt gag aca cgc tgg ctc	944		
Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu	250	255	260
aat gac gtt gtt ggc tat gtg gtc ggc aac gtt gtt ctg gga ttc agt	992		
Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn Val Val Leu Gly Phe Ser	265	270	275
gtc tgc tgg tgg aag acc aag cac aac ctg cat cat gct gct ccg aat	1040		
Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn	280	285	290
gaa tgc gac caa aag tac aca ccg att gat gag gat att gat act ctc	1088		
Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu	295	300	310
ccc atc att gct tgg agt aaa gat ctc ttg gcc act gtt gag agc aag	1136		
Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu Ala Thr Val Glu Ser Lys	315	320	325
acc atg ttg cga gtt ctt cag tac cag cac cta ttc ttt ttg gtt ctt	1184		
Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Leu Val Leu	330	335	340
ttg acg ttt gcc cgg gcg agt tgg cta ttt tgg agc gcg gcc ttc act	1232		
Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe Trp Ser Ala Ala Phe Thr	345	350	355
ctc agg ccc gag ttg acc ctt ggc gag aag ctt ttg gag agg gga acg	1280		
Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys Leu Leu Glu Arg Gly Thr	360	365	370

17

atg gct ttg cac tac att tgg ttt aat agt gtt gcg ttt tat ctg ctc 1328
Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser Val Ala Phe Tyr Leu Leu
375 380 385 390

ccc gga tgg aaa cca gtt gta tgg atg gtg gtc agc gag ctg atg tct 1376
Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val Val Ser Glu Leu Met Ser
395 400 405

ggc ttc ctg ctg gga tac gta ttt gta ctc agt cac aat gga atg gag 1424
Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu
410 415 420

gtg tac aat acg tca aag gac ttc gtg aat gcc cag att gca tcg act 1472
Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn Ala Gln Ile Ala Ser Thr
425 430 435

cgc gac atc aaa gca ggg gtg ttt aat gat tgg ttc acc gga ggt ctg 1520
Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu
440 445 450

aac aga cag att gag cat cat cta ttt cca acg atg ccc agg cac aac 1568
Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn
455 460 465 470

ctt aat aaa att tct cct cac gtg gag act ttg tgc aag aag cat gga 1616
Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr Leu Cys Lys Lys His Gly
475 480 485

ctg gtc tac gaa gac gtg agc atg gct tcg ggc act tac cgg gtt ttg 1664
Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Val Leu
490 495 500

aaa aca ctt aag gac gtt gcc gat gct gct tca cac cag cag ctt gct 1712
Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala Ser His Gln Gln Leu Ala
505 510 515

gcg agt tga ggcacgcag cactcgtcga aacatttttg tctgttatag 1761
Ala Ser
520

tggtcatatg tgatcgagg gaaaagggtcc catgctctga tctattcttc tgtagccaat 1821

atttttcaat tgaaaggagg ttcttcactt atcttccatc tatcgttgca catcctgcat 1881

cagagttagc gttggagtaa tgtaagcac ttgtagatta tgcccacat tgccacattt 1941

ctgttcggtt acaatcgtt gattccatgc tctctccgt gttcatctcg ttgttataag 2001

caagcttgaa aaaacatgct acgagattgg cagacgttgt cttggcagct gtagaggttg 2061

gttcattca ttgtgtagta cagaactctc tcgtccctgt ttctctacat tacttggttac 2121

18

H O I O O O

atagtgactt tcattcacag caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

2160

<210> 12

<211> 520

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 12

Met	Val	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Gln	Gly	Ser	Ile	Glu	Glu	Asn
1				5					10					15	

Ile	Asp	Val	Glu	His	Leu	Ala	Thr	Met	Pro	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Leu
			20					25					30		

Asn	Val	Leu	Gly	Thr	Thr	Leu	Gly	Gln	Trp	Ser	Leu	Ser	Thr	Thr	Phe
		35					40					45			

Ala	Phe	Lys	Arg	Leu	Thr	Thr	Lys	Lys	His	Ser	Ser	Asp	Ile	Ser	Val
	50						55				60				

Glu	Ala	Gln	Lys	Glu	Ser	Val	Ala	Arg	Gly	Pro	Val	Glu	Asn	Ile	Ser
65					70					75					80

Gln	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ile	Arg	Arg	Arg	Trp	Val	Gln	Asp	Lys	Lys
				85					90					95	

Pro	Val	Thr	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asp	Val	Ala	Ser	His	Asp	Met	Pro	Gln
		100						105					110		

Asp	Cys	Trp	Ile	Ile	Ile	Lys	Glu	Lys	Val	Tyr	Asp	Val	Ser	Thr	Phe
	115						120					125			

Ala	Glu	Gln	His	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Ile	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg
	130					135					140				

Asp	Ala	Thr	Asp	Val	Phe	Ser	Thr	Phe	His	Ala	Ser	Thr	Ser	Trp	Lys
145					150					155					160

Ile	Leu	Gln	Asn	Phe	Tyr	Ile	Gly	Asn	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Thr
			165						170					175	

Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	Glu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Arg	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg
			180					185					190		

Glu	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Lys	Thr	Leu
		195					200					205			

Ile	Asn	Val	Ser	Ile	Val	Ala	Thr	Ser	Ile	Ala	Ile	Ile	Ser	Leu	Tyr
	210					215					220				

19

H O I O S O O

Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe
225 230 235 240

Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val
245 250 255

Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn
260 265 270

Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu
275 280 285

His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp
290 295 300

Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu
305 310 315 320

Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His
325 330 335

Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe
340 345 350

Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys
355 360 365

Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser
370 375 380

Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val
385 390 395 400

Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu
405 410 415

Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn
420 425 430

Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp
435 440 445

Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro
450 455 460

Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr
465 470 475 480

Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser
485 490 495

20

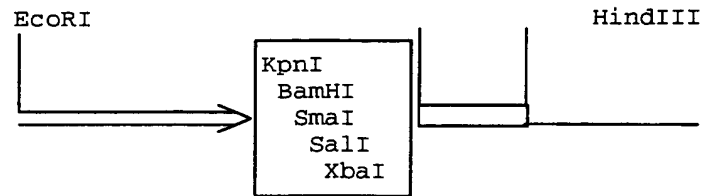
HUIOIO

Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala
500 505 510

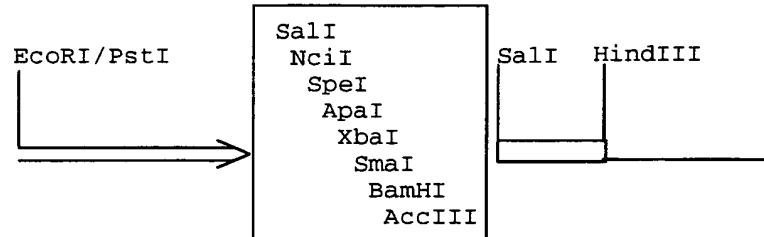
Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser
515 520

Fig. 1: Aufbau von Expressionskassetten

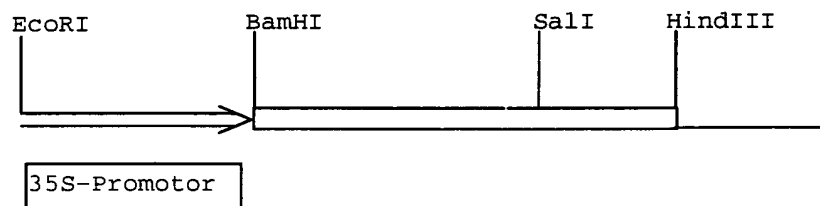
A) pBinAR



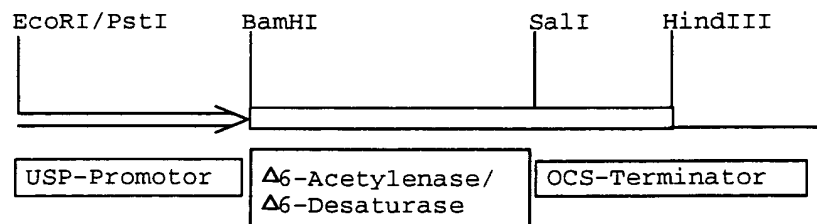
B) pBinUSP



C) pBinARI



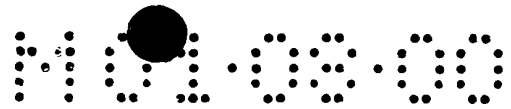
D) pBIN-USP Cer1



USP = unbekanntes Samenprotein

35S = Promotor aus Blumenkohl-Terminator

OCS = Octopin Synthase Terminator



$\Delta 6$ -Acetylenase und $\Delta 6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von

- 10 DNA Sequenzen codierend für $\Delta 6$ -Acetylenase/ $\Delta 6$ -Desaturasen bzw. $\Delta 6$ -Desaturasen zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit $\Delta 6$ -Dreifachbindungen und/oder $\Delta 6$ -Doppelbindungen.

15

Außerdem betrifft die Erfindung eine isolierte Nukleinsäuresequenz; eine Expressionskassette enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem be-

- 20 trifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

25

30

35

40

45

